

La brucellose bovine en Afrique centrale : VI. Identification et typage des souches isolées au Tchad et au Cameroun

par J. DOMENECH (1), M. J. CORBEL (2), E. L. THOMAS (2)[†] et Ph. LUCET (1)

(1) I.E.M.V.T., Laboratoire de Farcha, N'Djaména (Tchad).

I.E.M.V.T., 10, rue Pierre-Curie, 94704 Maisons-Alfort Cedex (France). Adresse actuelle : B.P. 25, Païta, Nouvelle Calédonie.

(2) Central Veterinary Laboratory, FAO/WHO Collaborating Center for Reference and Research on Brucellosis, New Haw, Weybridge, Surrey.

[†] Décédé.

RÉSUMÉ

Ce dernier article de la série sur la brucellose bovine en Afrique Centrale présente les résultats obtenus dans l'identification et le biotypage des souches isolées au Tchad et au Cameroun.

Si la majorité des isoléments est constituée par *Brucella abortus* biotype 3 (67 p. 100), l'homogénéité relevée par d'autres chercheurs n'est pas entièrement confirmée : 3 p. 100 des souches sont des *Brucella melitensis* biotype 1, 1 p. 100 des *Brucella abortus* biotype 2, 15 p. 100 des *Brucella abortus* biotype 6 et 14 p. 100 des *Brucella abortus* biotype intermédiaire 3/6.

La diversification des échantillons pathologiques analysés devrait clarifier ce point car, jusqu'à ce jour, l'essentiel des prélèvements est constitué par les liquides d'hygromas du genou, lésions fréquentes et faciles à repérer dans les troupeaux africains.

Les caractères biochimiques correspondent assez bien aux normes classiques des espèces de *Brucella*, avec, en particulier, une épreuve de l'oxydase positive pour 94 p. 100 des souches.

Bien que peu de souches aient fait l'objet d'une étude du métabolisme oxydatif, on note un profil voisin de celui de *Brucella abortus*. Cependant, l'utilisation de certains substrats rapproche une partie des souches centrafricaines analysées du profil habituel de *Brucella suis*.

L'étude de la brucellose bovine en Afrique centrale, menée de 1976 à 1980 se termine ici par l'analyse de 95 souches de *Brucella* isolées au Tchad et au Cameroun.

L'identification du genre et de l'espèce est suivie du biotypage, aujourd'hui assez couramment réalisé à partir des enquêtes en élevage et dont l'intérêt épidémiologique n'échappe à personne (2, 7, 10).

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Souches étudiées

— La localisation géographique des 95 souches analysées est présentée dans l'article III, figure 1, de cette série sur la brucellose bovine en Afrique Centrale (4).

— Les sérosités, sécrétions et tissu patho-

logiques prélevés sont les suivants : liquides d'hygromas (60 p. 100 des souches), mucus vaginaux (25 p. 100), avortons (5 p. 100), placentas (5 p. 100) et laits (5 p. 100).

Les proportions citées sont approximatives car la perte de certains documents, lors de la guerre civile du Tchad, nous a malheureusement privé des chiffres plus précis.

— Milieux de culture :

Le milieu utilisé est soit le milieu W.E. modifié par RENOUX (9), (« *Brucella* agar modifié (*) »), additionné de polymyxine, bacitracine et cycloheximide), soit celui de FARRELS (1, 5), (même milieu de base additionné de polymyxine, bacitracine, cycloheximide, vancomycine, acide nalidixique et nystatine) selon que l'ensemencement avait lieu au laboratoire ou sur le terrain.

Chaque prélèvement était mis en culture en atmosphère normale et en atmosphère CO₂ convenable (Gaspak Anaerobic System).

1.2. Identification

— Caractères du genre :

Sont étudiés les caractères cités au chapitre résultats, selon les méthodes prévues par ALTON (1) et STABLEFORTH (8).

— Caractères d'espèce et de biotype :

Nous avons appliqué aux 95 souches les épreuves recommandées par le Sous-Comité de la Taxonomie des *Brucella* (8) reprises par d'autres auteurs (1, 6, 9) = exigence en CO₂, production de H₂S, croissance en présence de thionine et de fuschine, lyse par le phage Tbilisi et agglutination par les sérums monospécifiques anti A et anti M.

— Caractères complémentaires :

Pour 76 souches, sont recherchées :

- l'agglutination avec le sérum monospécifique anti R (Rough),
- la sensibilité aux phages Weybridge, Berkeley, Rough/Ovis, Rough et Rough/Canis,
- la croissance en présence de safranine 0, pyronine Y, bleu de thionine, méthyl violet, vert malachite, fucidine, framycétine, carbénicilline (concentrations = cf. tabl. II et III).

— Activité respiratoire :

7 souches ont fait l'objet d'une étude du métabolisme oxydatif vis-à-vis des 13 substrats indiqués dans le tableau III. Les valeurs des QO₂(N) sont obtenues sur un respiromètre de GILSON (3).

2. RÉSULTATS

2.1. Caractéristiques du genre *Brucella*

Morphologie : coccobacille, non sporulé, non encapsulé.

Coloration de Gram : négatif.

Culture : typique (petites colonies lisses en 3 à 8 jours).

Mobilité : négative.

Fermentation du lactose sur gélose MacConkey : négatif.

Hémolyse sur gélose au sang : négatif.

Acidification du glucose en eau peptonée au rouge de phénol : négatif.

Catalase : positif.

Oxydase (cf. tabl. II) : positif = 94 p. 100 des souches étudiées (100 p. 100 pour *Br. abortus* biotype 6).

Uréease : négatif = 6 p. 100.

Uréease : positif en 15 mn = 42 p. 100 des souches étudiées.

Uréease : positif en 1 à 2 h = 39 p. 100 des souches étudiées.

Uréease : positif en plus de 2 h = 19 p. 100 des souches étudiées.

Réduction des nitrates : positif.

Utilisation du citrate (Simmons) : négatif.

2.2. Identification des espèces et biotypes

2.2.1. Résultats des épreuves classiques effectuées sur les 95 souches

— exigence en CO₂ = négatif pour toutes les souches, y compris *Br. abortus* biotype 2, ce qui est inhabituel ;

— production de H₂S = positif pour *Brucella abortus* biotypes 2, 3, 6 et 3/6,

• négatif pour *Brucella melitensis* biotype 1 ;

— croissance en présence de :

• Thionine à 1/50 000 = positif ;

1/100 000 = positif ;

• Fuschine à 1/25 000 = positif ;

1/50 000 = positif ;

1/100 000 = positif ;

(*) Biomerieux, Marcy l'Etoile, 69260 Charbonnières-les-Bains, France.

TABL. N°I-Identification des espèces et biotypes de *Brucella* à partir de l'analyse des 95 souches

Origine géographique	Br. melitensis biotype 1	Brucella abortus				total
		biotype 2	biotype 3	biotype 6	intermédiaire 3/6	
<u>TCHAD</u>						
lac Tchad	1	0	8	6	7	22
Centre	0	0	1	2	0	3
Sud	0	0	15	3	5	23
Ouest	0	0	3	0	0	3
<u>CAMEROUN</u>						
lac Tchad	2	1	15	2	0	20
Nord	0	0	18	1	1	20
Adamaoua	0	0	4	0	0	4
TOTAL	3	1	64	14	13	95

— agglutination avec les sérums monospécifiques :

- anti A : positif pour *Brucella abortus*, négatif pour *Brucella melitensis* ;
- anti M : positif pour *Brucella melitensis*, négatif pour *Brucella abortus* ;

— lyse par le phage Tbilisi (Dilution courante d'épreuve D.C.E., et 10^4 D.C.E. :

- positif pour *Brucella abortus*,
- négatif pour *Brucella melitensis*.

De ces résultats sont déduits les biotypes cités dans le tableau I.

2.2.2. Caractéristiques complémentaires étudiées sur 76 souches *Brucella abortus* biotypes 3, 6 et intermédiaire 3/6 (*)

— caractéristiques communes aux 76 souches :

- agglutination par l'acriflavine : négatif,
- agglutination par le sérum monospécifique anti R = négatif,
- lyse par les phages (dilution courante d'épreuve D.C.E. et 10^4 D.C.E.) ;
+ Florence (Firenze = Fz) ; Weybridge (Wb) ; Berkeley (Bk) ; Rough (R) et Rough/Ovis (R/O) = positif,
+ Rough/Canis (R/C) = négatif ;

(*) Certaines de ces épreuves ont également été appliquées aux souches de *Brucella melitensis* et *Brucella abortus* biotype 2 :

- *Brucella melitensis* est lysé par le phage Bk, non lysé par Fz, Wb et R, et non agglutiné par le sérum anti R.
- *Brucella abortus* biotype 2 est lysé par les phages Fz, Wb, Bk et R, et non agglutiné par le sérum anti R.

TABL. N° II—Caractéristiques de 76 souches de *Brucella abortus* : division en 25 groupes

Groupe	Biotype	Nombre de souches	Oxydase	Croissance en présence de =							Novobio- cine 5µ g
				Thionine 1/25 000	Bleu Thionine 1/500 000	Pyronine 1/50 000	Violet de Méthyle 1/100 000	Céphalo- tine 30µ g	Kanamyci- ne 5 µg		
1	3	23	+	+	+	+	+	+	+	+	
2		1	+	+	+	+	+	+	+	+	
3		2	+	+	+	+	+	+	+	+	
4		3	+	+	+	+	+	+	+	+	
5		1	+	+	+	+	+	+	+	+	
6		3	-	+	+	+	+	+	+	+	
7		6	+	+	+	+	+	+	+	+	
8		1	+	+	+	+	+	+	+	+	
9		1	+	+	+	+	+	+	+	+	
10		6	+	+	+	+	+	+	+	+	
11		1	+	+	+	+	+	+	+	+	
12		1	+	+	+	+	+	+	+	+	
13		1	+	+	+	+	+	+	+	+	
14	intermé- diaire 3/6	4	+	(1)	+	+	+	+	+	+	
15		1	+	+	+	+	+	+	+	+	
16		2	+	+	+	+	+	+	+	+	
17		1	-	+	+	+	+	+	+	+	
18		1	+	+	+	+	+	+	+	+	
19		4	+	+	+	+	+	+	+	+	
20	6	2	+	-	+	+	+	+	+	+	
21		5	+	-	+	+	+	+	+	+	
22		2	+	-	+	+	+	+	+	+	
23		2	+	-	+	+	+	+	+	+	
24		1	+	-	+	+	+	+	+	+	
25		1	+	-	+	+	+	+	+	+	

(1) résistance partielle.

• croissance en présence de :

safranine O à 1/5 000 = positif,
safranine O à 1/10 000 = positif,
pyronine Y à 1/500 000 = positif,
méthyl violet à 1/800 000 = positif,
vert malachite à 1/500 000 = positif,
fucidine à 1/100 000 = négatif,
framycétine à 1/10 000 = négatif,
carbénicilline à 1/10 000 = négatif ;

— croissance en présence de thionine (1/25 000), bleu de thionine (1/500 000) pyronine Y (1/50 000), violet de méthyle (1/100 000), céphalotine (30 µg/ml), kanamycine (5 µg/ml) novobiocine (5 µg/ml) = cf. tableau II.

Ces épreuves, ajoutées à l'étude de l'oxydase, ont permis de classer les 76 souches en 25 groupes différents (cf. tabl. II). L'étude statistique (test de Fisher) précise le degré de similarité entre ces divers groupes ainsi que la validité des épreuves utilisées pour les distinguer.

2.3. Métabolisme oxydatif

Le tableau III donne les résultats obtenus sur 7 souches de *Brucella abortus*. Une huitième souche, appartenant au biotype 3, a été étudiée par une technique en chromatographie sur cou-

che mince (5) : le profil métabolique obtenu est également rapporté.

3. DISCUSSION

Quelques points paraissent intéressants à relever et discuter.

— Nous n'avons pas retrouvé une homogénéité d'espèce et de biotype aussi nette que celle relevée par certains auteurs (10) : nous avons en effet isolé *Brucella melitensis* (3 p. 100 des souches), *Brucella abortus* biotype 2 (1 p. 100), *Brucella abortus* 3 (67 p. 100), *Brucella abortus* biotype 6 (15 p. 100) et *Brucella abortus* biotype intermédiaire 3/6 (14 p. 100).

L'explication de cette différence, par rapport à d'autres enquêtes, pourrait résider dans la plus grande variété symptomatique observée sur les animaux à partir desquels les souches ont été obtenues dans la plus grande dispersion géographique des lieux de prélèvement (cf. carte (4, III) = plus de 1 000 km entre les points extrêmes de la zone considérée) et dans le nombre limité de souches biotypées dans un troupeau donné (jamais plus de deux) et dans un même village (trois ou quatre au maximum).

— Il faut cependant souligner que, comme au Sénégal (10), le biotype 3 de *Brucella abor-*

TABLEAU N°III-Etude du métabolisme oxydatif(1) de 7 souches de *Brucella abortus*

Biotype	Souche	L alanine	L asparagine	Acide L glutamique	L arginine	D L ornithine	D L citrulline	L lysine	L arabinose	D galactose	D glucose	D ribose	D xylose	i érythritol
3 (2)	NG 495	120	39	90	17	70	(3)	0	117	116	79	232	98	236
6	K 45 919	219	179	261	169	83	112	-	205	175	291	193	144	240
	F 177	313	300	283	101	-	47	52	158	148	302	86	206	92
	F 183	101	81	135	17	53	51	-	100	129	234	211	54	89
	K 40 657	110	0	96	41	75	36	0	117	77	135	-	75	201
	B 379	88	0	60	60	28	-	6	-	138	-	308	96	229
	K 43 280	3	0	0	394	164	109	104	246	289	156	466	242	416
	X : valeur moyenne	136	85	132	114	79	71	40	157	153	171	220	130	215
(4)														
Profil habituel de :														
<i>Brucella abortus</i> (biotype	65 -	80 -	140 -	15 -	0 -	0 -	0 -	45 -	50 -	108 -	103 -	10 -	210 -	
1 à 9)	172	198	420	48	50	50	25	187	230	430	349	93	462	

1) - métabolisme oxydatif exprimé en microlitres d'oxygène utilisés par milligramme d'azote et par heure, après soustraction du taux de respiration endogène : QO_2 (N)

2) - une deuxième souche appartenant au biotype 3 a été étudiée par une technique en chromatographie sur couche mince. Son profil est, dans l'ordre des substrats présentés dans ce tableau, le suivant : +, +, +, -, -, -, -, -, -, +, +, +, -, +.

3) - oxydation du substrat non étudiée

4) - référence bibliographique : CORBEL M.J. et Coll - 1978 (3)

tus domine : 64 souches sur 95. La majorité des prélèvements a, ici aussi, été constituée par des liquides d'hygromas (60 p. 100 environ).

La diversification des échantillons pathologiques devrait déboucher sur une meilleure connaissance des biotypes présents sur le continent africain : BALE (2), dans une publication récente, en apporte une preuve au Nigéria, en isolant les biotypes 1, 3 et 4.

— On n'observe, dans la région étudiée, aucune corrélation entre l'origine géographique de la souche et son biotype.

— La réaction biochimique oxydase positive trouvée dans 94 p. 100 des cas, rend les souches d'Afrique Centrale beaucoup plus conformes aux caractères de l'espèce *Brucella abortus* que ne le sont les souches isolées en Afrique de l'Ouest (10).

— Les données du tableau II divisent l'ensemble des 76 souches considérées en 25 groupes. Cependant, le calcul statistique (test de Fisher) montre que la seule différence significative réside dans la sensibilité à la thionine au 1/25 000. De même cette épreuve est-elle à la base de la ségrégation entre les biotypes 3 et 6 de *Brucella abortus*. Si on considère l'existence de souches présentant une résistance partielle à la thionine au 1/25 000, il devient évident que les biotypes 3 et 6 sont très proches, sinon identiques.

— Le métabolisme oxydatif des *Brucella abortus* étudiées correspond globalement au profil classique de cette espèce, avec néanmoins quelques réactions inhabituelles. Les consommations d'oxygène pour, en particulier, le D xylose (niveaux QO_2 N élevé) et la L asparagine (niveaux QO_2 N bas) observées pour certaines des souches analysées rapprochent ces dernières de *Brucella suis* biotypes 1 et 2 (3). Ces deux résultats ont déjà été signalés par J. M. VERGER et collab. au Sénégal (10) = le D xylose et la L asparagine pourraient se révéler être deux marqueurs épidémiologiques utilisables dans l'identification des *Brucella abortus* en Afrique.

4. CONCLUSION

Ce sixième article clôt la série de publications que nous avons consacrée à l'étude de la brucellose bovine en Afrique centrale.

Bien que certains points n'aient pu, pour des raisons indépendantes de notre volonté, être approfondis (par exemple l'efficacité de la vaccination dans les conditions d'élevage africain), nous espérons avoir ainsi augmenté les informations connues sur cette maladie. Nous sommes convaincus que, dans la mesure où les grandes épizooties peuvent être jugulées par les

campagnes de prophylaxie médicale, et où les projets d'élevages améliorés semi-intensifs se multiplient, la brucellose bovine devient un des problèmes infectieux majeurs contre lequel il convient de lutter.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier tous les responsables de l'élevage du Tchad, du Cameroun et de

la C.B.L.T. (Commission du Bassin du Lac Tchad) sans lesquels cette étude eût été impossible.

Notre gratitude s'adresse également à Y. CHENEAU, Directeur du Laboratoire de Farcha (Tchad), dont l'appui constant nous a permis de réaliser cette enquête, ainsi qu'aux techniciens de laboratoire des services de bactériologie et de sérologie et tout particulièrement à M. BOUBA BITSIS, dont la compétence et le dévouement n'ont, durant ces quatre années, jamais été mis en défaut.

SUMMARY

Cattle brucellosis in Central Africa.

IV. Identification and typing of strains isolated in Chad and Cameroon

This last paper of the series on cattle brucellosis in Central Africa give the results obtained after the identification and the biotyping of the strains isolated in Cameroon and Chad.

Though most of the strains isolated were identified as being *Brucella abortus* biotype 3 (67 p. 100), the homogeneity recorded by other research-workers was not confirmed : 3 p. 100 of the strains were *Brucella melitensis* biotype 1, 1 p. 100 *Brucella abortus* biotype 2, 15 p. 100, *Brucella abortus* biotype 6 and 14 p. 100, *Brucella abortus* intermediate biotype 3/6.

The examination of a more varied range of pathological samples should enable to clarify this point since, up to now, most of the samples consisted of samples taken from knee hygromas which is a widespread lesion easy to diagnose in African herds.

The biochemical characteristics of the samples fit quite well with the standards defined for the *Brucella* species. Particularly, the oxydase test was positive for 94 p. 100 of the strains.

Although the oxydative metabolic tests have been carried out on few strains, the pattern of the oxydative metabolism of those strains is close to that of *Brucella abortus*. However, the use of some substrates makes some strains of Central Africa closer to the usual metabolic pattern of *Brucella suis*.

RESUMEN

La brucelosis bovina en África central.

VI. Identificación y tipificación de cepas aisladas en Chad y en Camerún

Este último artículo de la serie sobre la brucelosis bovina en África Central presenta los resultados obtenidos para la identificación y la biotipificación de cepas aisladas en Chad y en Camerún.

Si *Brucella abortus* biotipo 3 constituye la mayor parte de los aislamientos (67 p. 100), no se confirma completamente la homogeneidad observada por otros investigadores : 3 p. 100 de las cepas son *Brucella melitensis* biotipo 1, 1 p. 100 *Brucella abortus* biotipo 2, 15 p. 100 *Brucella abortus* biotipo intermediario 3/6.

La diversificación de las muestras patológicas analizadas deberían de esclarecer dicho punto porque, hasta ahora, los líquidos de los higromas de la rodilla, lesiones frecuentes y fáciles de identificar en los rebaños africanos constituyen el esencial de las muestras.

Los caracteres bioquímicos corresponden bastante bien a las normas clásicas de las especies de *Brucella*, con, en particular, una prueba positiva de la oxidasa por 94 p. 100 de las cepas.

Aunque pocas cepas han sido objeto de un estudio del metabolismo oxidativo, se nota un perfil vecino del de *Brucella abortus*. Sin embargo, la utilización de ciertos substratos se parece a una parte de las cepas centroafricanas analizadas del perfil habitual de *Brucella suis*.

BIBLIOGRAPHIE

1. ALTON (G. G.), JONES (L. M.), PIETZ (D. E.). La brucellose. Techniques de laboratoire, 2^e éd., Genève, O.M.S., 1977 (O.M.S. n° 55).
2. BALE (O. O. J.), KUMI, DIAKA (J.). Serological and bacteriological study of bovine brucellosis from livestock investigation and breeding centers in Nigeria. *Brit. vet. J.*, 1981, **137** : 256-261.
3. CORBEL (M. J.), GILL (K. P. W.), THOMAS (E. L.). Methods for the identification of Brucella, Weybridge, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Central veterinary laboratory, 1978.
4. DOMENECH (J.) et collab. La brucellose en Afrique Centrale. I et II : *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1980, **33** (3) : 271-276 et 277-284 ; III, IV : *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1982, **35** (1) : 15-22 et 23-26 ; V : *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1982, **35** (2).
5. MEYER (M. E.). Advances in research on brucellosis, 1957-1972. *Adv. vet. Sci. comp. Med.*, 1974, **18**, New York, Academic Press.
6. MORGAN (W. J. B.), Mac KINNON (D. J.), GILL (K. P. W.), NORRIS (P. I. W.). Brucellosis diagnosis, standard laboratory techniques, 2nd ed. Weybridge, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Central Veterinary Laboratory, 1978.
7. PILO-MORÓN (E.), PIERRE (F.), KOUAME (J. B.). La brucellose bovine en Côte-d'Ivoire. *Epidémiologie. Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1979, **32** (4) : 325-353.
8. STABLEFORTH (A. W.), JONES (L. M.). Report of the subcommittee on taxonomy of the genus *Brucella*. *Int. Bull. Bacteriol. Nomen. Taxon.*, 1963, **13** : 145-158.
9. RENOUX (G.), GAUMONT (R.). Méthodes de diagnostic biologique des brucelloses animales. In : les cahiers techniques du C.N.R.S. XII. Pathologie de la Production du lait, 1966, 51 p.
10. VERGER (J. M.), GRAYON (M.), DOUTRE (M. P.), SAGNA (F.). *Brucella abortus* d'origine bovine au Sénégal : identification et typage. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1979, **32** (1) : 25-32.